

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/98528 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/00 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02274
- (22) Internationales Anmeldedatum:
19. Juni 2001 (19.06.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 29 915.6 19. Juni 2000 (19.06.2000) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).
- (74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).
- Veröffentlicht:**
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. First, genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, 5-methylcytosine and cytosine reacting differently. The pre-treated DNA is then amplified with primers from a different sequence using a polymerase. In the following step, the amplified genomic DNA is hybridised to an oligonucleotide array and PCR products are obtained which must be provided with an identifying mark. Alternatively, the PCR products can be extended in a Primer Extension Reaction, the extension products also being provided with an identifying mark. The last step involves examining the extended oligonucleotides for the presence of the identifying mark.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben. Zuerst wird eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren. Anschließend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase mit Primern unterschiedlicher Sequenz amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und PCR-Produkte erhalten, die mit einer Markierung versehen sein müssen. Alternativ können die PCR-Produkte in einer Primer Extension Reaktion verlängert werden, wobei auch die Verlängerungsprodukte mit einer Markierung versehen sind. Im letzten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.

WO 01/98528 A2

BEST AVAILABLE COPY

Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in
10 RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist
15 mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms .

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil
25 genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-
30 Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die inzwischen am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-
35 Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer

Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255.

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnick, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden

kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nät. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine
5 „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen..
Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung be-
10 schrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997),
15 Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al.
20 (1995), Gene 157, 261; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999), der dort zitierten Literatur und dem US-Patent 5994065 über Methoden zur Herstellung von festen Trägern für Zielmoleküle wie Oligonukleotide bei vermindertem nichtspezifischem Hintergrundsignal entnehmen.
25
30

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das
35 einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der

hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

5 Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karras, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000
10 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird die Ionisation des
15 Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

20 MALDI-TOF Spektroskopie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995)), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für
25 Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektroskopie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die
30 eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlererweile einige ansprechende Matrices, jedoch

wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchsproben gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

Harnstoff verbessert die Effizienz der Bisulfit-Behandlung vor der Sequenzierung von 5-Methylcytosin in genomischer DNA (Paulin R, Grigg GW, Davey MW, Piper AA. (1998), Nucleic Acids Res. 26: 5009-5010).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher eine Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA zur Verfügung zu stellen, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass ein Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in DNA zur Verfügung gestellt wird, wobei man folgende Arbeitsschritte aus-

führt:

- a) eine genomische DNA-Probe wird mit einer Lösung eines Bisulfits (= Hydrogensulfit, Disulfit) im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 6 mol/l inkubiert, wobei ein denaturierendes Reagenz und/oder Lösemittel sowie mindestens ein Radikalfänger zugegen ist;
- b) die behandelte DNA-Probe wird mit Wasser oder einer wässrigen Lösung verdünnt;
- c) die DNA-Probe wird in einer Polymerasereaktion amplifiziert;
- d) man detektiert, inwieweit sich die Sequenz durch die Behandlung nach Schritt a) gegenüber der genomischen DNA-Probe verändert hat und schließt auf den Methylierungsstatus zumindest eines Locus in der genomischen DNA-Probe.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es dabei, dass das denaturierende Reagenz und/oder Lösungsmittel aus der folgenden Liste von Verbindungen oder Verbindungsklassen ausgewählt ist:

Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO, THF.

Bevorzugt ist dabei ferner, dass der Radikalfänger aus der folgenden Gruppe von Verbindungen ausgewählt ist:

Di-, Trihydroxybenzole, Grüntee Extrakt (green tea extract), Pycnogenol (pine bark extract), Ginkgo Biloba Extrakt (EGb 761), Flavonoid-Mischung verschiedener Frucht- und Gemüseextrakte (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karbonsäure), 2,6-Di-tert-

- butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbetacarboxyethyl-germanium-sesquioxid, Superoxid-Dismutase (SOD), Superoxid-Katalase, Alpha-Naphthoflavin, , Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionat und Cu(II)-Derivate, Mebendazol, CS (Chloroformlöslicher) Alkaloid-Extrakt,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion,
- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,

- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-
[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl,
5 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
10 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
15 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
20 3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-anthrachinon,
25 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-anthrachinon,
5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-diol,
3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1-ol,
30 4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat,
35 4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure,

- Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-benzoesäure,
4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
5 Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-azo)-benzoat,
4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
10 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-trion,
15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-
20 1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
25 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
30 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphthochinon,

- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
5 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
10 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
20 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.

25

Erfindungsgemäß bevorzugt ist dabei, dass man die genomische DNA-Probe vor der Behandlung thermisch denaturiert.

- Besonders erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass man den Schritt c) in zwei Teilschritten wie folgt durchführt:
- 30 a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben;
- 35 b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz,

die jeweils zu einem Abschnitt der nach Anspruch 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

5

Es ist erfindungsgemäß weiterhin bevorzugt, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt.

10

Bevorzugt ist es erfindungsgemäß außerdem, dass man für die Polymerasereaktion eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.

15

Besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man vor Schritt c) des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Desulfonierung der DNA durchführt.

20

Es ist auch bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:

25

a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

30

(b) man das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

35

Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausgeführt:

- 5 (a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende
10 unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das
15 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;
- 20 (b) man das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen,
25 wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;
- (c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und
30 das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten
35 Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.

Dabei ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, dass die verwendeten Oligonukleotide der ersten Spezies und/oder die verwendeten Oligonukleotide der zweiten Spezies entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.

Es ist außerdem erfindungsgemäß bevorzugt, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:

(a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

(b) man das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

Es ist auch erfindungsgemäß bevorzugt, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht. Dabei ist es besonders bevorzugt, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen und/oder dass die Markierungen Radionuklide sind. Besonders bevorzugt ist es dabei, dass die Markierungen der Nukleotide ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachweisbar sind.

Insbesondere ist es auch bevorzugt, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

5 Bevorzugt ist es erfindungsgemäß auch, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist.

10 Das erfindungsgemäße Verfahren ist bevorzugt auch dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.

15 Es ist weiterhin bevorzugt, dass man zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente mit einer einzelnen positiven oder negativen Nettoladung versieht.

20 Ganz besonders bevorzugt ist es, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mit-
25 tels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist auch derart bevorzugt, in dem man die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhält, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum,
30 Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombi-
35 nationen hiervon umfassen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist schließlich ein Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie eine Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem erfindungsgemäßen Verfahren.

Die vorliegende Erfindung stellt ein automatisierbares Verfahren zum Nachweis von Methylcytosin bereit, welches

nur Pipettierschritte enthält. Dadurch wird die Effizienz bestehender Verfahren in Bezug auf die Einfachheit der Handhabung, die Qualität, die Kosten und vor allem den Durchsatz verbessert.

5

Beschrieben wird ein automatisierbares Verfahren zum Nachweis von Methylcytosin in genomischen DNA-Proben:

10

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

15

Im ersten Schritt des Verfahrens behandelt man die eingesetzte DNA bevorzugt mit Bisulfit, (= Disulfit, Hydrogensulfit) derart, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben.

20

25

Die genomische DNA-Probe denaturiert man besonders bevorzugt vor der Behandlung thermisch.

30

Wird für die Reaktion Bisulfit im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 und 6 mol/l verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Für das erfindungsgemäße Verfahren müssen zudem ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein.

Dabei kommen als denaturierende Reagenzien oder Lösungsmittel bevorzugt die folgenden Verbindungen oder Verbindungsklassen in Frage:

- 5 Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substituierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril, primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alkohole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykoldialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pentaethylenglykoldialkylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO oder THF.
- 10

Als Radikalfänger ist die Gruppe der in Liste 1 aufgelisteten Verbindungen oder deren Derivate vorzugsweise geeignet. Die anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil.

15

Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschließend eine Desulfonierung der DNA (10-30 min, 90-100 °C) bei alkalischem pH-Wert durchgeführt.

20

Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten wird vorzugsweise in einem Reaktionsgefäß gemacht.

25

Den Verfahrensschritt führt man vorzugsweise in zwei Teilschritten durch. Man beginnt mit einer PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, welche die vorbehandelte DNA Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben. Danach führt man eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz durch, die jeweils zu

30

35

einem Abschnitt der vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

5 Dabei ist es klar, dass derartige Präamplifikationen häufig nicht als PCR Reaktionen, sondern als Primerextensionsreaktionen ausgeführt werden, die keine hitzebeständige Polymerase erfordern.

10 Im letzten Verfahrensschritt detektiert man, inwieweit sich die Sequenz durch die Behandlung mit einem Bisulfit enthaltenen Reagenz gegenüber der genomischen DNA-Probe verändert hat und schließt auf den Methylierungsstatus zumindest eines Locus in der genomischen DNA-Probe.

15

Für die Detektion werden die PCR-Produkte besonders bevorzugt auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert.

20 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man nach der Hybridisierung auf einen Oligonukleotid Array die folgenden Teilschritte durch:

a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit
25 ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

30

(b) das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden wird mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen
35 DNA-Probe abhängt.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens führt man nach der Hybridisierung auf einen Oligonukleotid Array die folgenden Teilschritte durch:

5

(a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;

20

(b) das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden wird mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;

25

(c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-

30

35

Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt, welches bevorzugt phosphoryliert vorliegt.

5

Die verwendeten Oligonukleotide der ersten Spezies und/oder die verwendeten Oligonukleotide der zweiten Spezies enthalten besonders bevorzugt entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G.

10

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens führt man nach der Hybridisierung auf einen Oligonukleotid Array die folgenden Teilschritte durch:

- 15 (a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die
20 hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

- (b) das Oligonukleotid wird, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu unter-
25 suchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

30

Die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte sind für die Detektion besonders bevorzugt mit einer nachweisbaren Markierung versehen.

- 35 Vorzugsweise sind die Markierungen der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte

Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

5 Die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte können vorzugsweise insgesamt im Massenspektrometer nachgewiesen werden und sind somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert.

10 Besonders bevorzugt weist man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nach.

15 Das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts erzeugt man bevorzugt durch Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen.

20 Zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer weisen die erzeugten Fragmente besonders bevorzugt eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.

25 Die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte detektiert und visualisiert man vorzugsweise mittels Matrix assistierter Laser Desorption/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI).

30 Das vorliegende Verfahren wird bevorzugt verwendet zur Diagnose und/oder Prognose von nachteiligen Ereignissen für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, 35 psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädi-

gungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes;
5 Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut,
10 der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Das neue Verfahren dient ferner besonders bevorzugt zur
15 Unterscheidung von Zelltypen, Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Kit, das ein Bisulfit enthaltene Reagenz, denaturierende Reagenzien oder Lösungsmittel, sowie Radikalfänger gemäss
20 Liste 1, Primer zur Herstellung der Amplifikate und eine Anleitung zur Durchführung eines Assays enthält.

25 Liste 1:

Di-, Trihydroxybenzole, Grüntee Extrakt (green tea extract), Pycnogenol (pine bark extract), Ginkgo Biloba Extrakt (EGb 761), Flavonoid-Mischung verschiedener
30 Frucht- und Gemüseextrakte (GNLD), , Bio-Normalizer (Sun-O Corp),
DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure),
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-
35 karbonsäure),

- 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-
5 132 Bisbetacarboxyethyl-germanium-sesquioxid, Superoxid-Dismutase (SOD), Superoxid-Katalase, Alpha-Naphthoflavin, , Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionat und Cu(II)-Derivate, Mebendazol, CS (Chloroformlöslicher) Alkaloid-
10 Extrakt,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon,
15 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon,
20 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon,
25 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
30 3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion,
35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,

- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-
epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on, 3,3-Bi-
[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl,
5 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-
10 tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
15 2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
20 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-
anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-
anthrachinon,
25 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-
anthrachinon,
5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-
diol,
3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-
30 tetrahydronaphthalin-1-ol,
4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-
hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat,
35 4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-
benzoesäure,

- Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-
benzoesäure,
4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-
hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
5 Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl-
azo)-benzoat,
4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-
hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
10 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-
tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-1,2,4-
trion,
15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-
20 1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-
1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-
1,4-naphthochinon,
25 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-
1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-
30 dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-
methyl-1,4-naphthochinon,

- 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
5 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
10 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
20 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon.

25

Das folgende Beispiel erläutert die Erfindung.

30 Beispiel:

Automatisierte Durchführung der Bisulfitreaktion.

Im vorliegenden Beispiel wird die Anwendung des Verfahrens zum Nachweis des Methylierungsstatus von Cytosinen im Faktor VIII-Gen einer genomischen DNA-Probe, die mit
35 einer Restriktionsendonuclease nach Angabe des Herstel-

lers behandelt wurde, beschrieben. Das Verfahren beruht auf dem Einsatz eines automatischen Pipettiersystems (MWG RoboSeq 4204) mit vier separat vertikal beweglichen Adaptoren für austauschbare Pipettierspitzen, die Kreuzkontaminationen ausschließen. Das Pipettiersystem ermöglicht das Pipettieren von 100µl mit einem Fehler von weniger als $\pm 2\mu\text{l}$. Die Arbeitsplatte des automatischen Pipettiersystems ist mit sechs Gestellen für Pipettierspitzen und acht Pipettierpositionen, von denen zwei gekühlt werden können, einem kühlbaren Reagenziengestell, einem Stapelsystem für 10 Mikrotiterplatten, einer Pipettierspitzenwaschstation und einer Vorrichtung zur Trennung der Pipettierspitzen vom Adaptor ausgerüstet. Das automatische Pipettiersystem ist über eine serielle Schnittstelle mit einem Computer verbunden und wird über ein Softwareprogramm, das die freie Programmierung aller für zur Anwendung des Verfahrens notwendigen Pipettierschritte erlaubt, gesteuert.

Im ersten Verfahrensschritt wird von Hand ein Aliquot der DNA-Probe in eine von 96 frei wählbaren Positionen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird anschließend unter Verwendung eines Eppendorf Mastercycler zur Denaturierung der vorbehandelten DNA-Probe auf 96°C erwärmt. Die Mikrotiterplatte wird dann in das automatische Pipettiersystem überführt. In alle Positionen, die DNA enthalten, werden programmgesteuert nacheinander aus dem Reagenziengestell Aliquots eines denaturierenden Agens (Dioxan), einer 3,3 molaren Natriumhydrogensulfitlösung, und einer Lösung eines Radikalfängers in dem verwendeten denaturierenden Agens hinzu pipettiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte im Eppendorf Mastercycler inkubiert, dass in der DNA-Probe unter Einwirkung des Natriumhydrogensulfits alle unmethylierten Cytosinreste in ein Bisulfitaddukt umgewandelt werden.

Nach der Bisulfitbehandlung wird die Mikrotiterplatte aus dem Thermocycler in das automatische Pipetiersystem überführt. Es wird eine zweite Mikrotiterplatte desselben Typs vorgelegt. In alle Kammern, deren äquivalente Position auf der ersten Mikrotiterplatte eine bisulfitbehandelte DNA-Probe enthält, wird zuerst ein basischer Tris-HCl Puffer (pH 9.5) und anschließend wird ein Aliquot der bisulfitbehandelten DNA in die entsprechende Position der zweiten Mikrotiterplatte übertragen. In der basischen Lösung werden die Bisulfitaddukte der nichtmethylierten Cytosinreste zu Uracilresten umgewandelt.

Die gezielte Amplifikation eines Stranges (im vorliegenden Beispiel der sense-Strang) der bisulfitbehandelten DNA erfolgt durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR). Es wird ein Primerpaar des Typs 1 (AGG GAG TTT TTT TTA GGG AAT AGA GGG A (SEQ-ID:1) und TAA TCC CAA AAC CTC TCC ACT ACA ACA A (SEQ-ID:2)) verwendet, das die spezifische Amplifikation eines erfolgreich bisulfitbehandelten DNA-Strangs, nicht jedoch eines DNA-Strangs, dessen nichtmethylierte Cytosinreste nicht oder unvollständig in Uracilreste umgewandelt wurden, erlaubt. Für die PCR-Reaktion wird im automatischen Pipettiersystem eine dritte Mikrotiterplatte desselben Typs vorgelegt. In alle Kammern, deren äquivalente Positionen auf der ersten Mikrotiterplatte eine bisulfitbehandelte DNA-Probe enthält, wird zuerst ein Aliquot einer Stammlösung, die einen PCR-Puffer, eine DNA-Polymerase und Primer des Typs 1 enthält, automatisch pipettiert. Danach wird automatisch aus jeder Position der zweiten Mikrotiterplatte ein Aliquot der verdünnten bisulfitbehandelten DNA in die entsprechende Position der dritten Mikrotiterplatte übertragen, bevor diese zur Durchführung der PCR-Reaktion in den Cycler überführt wird. Das PCR-Produkt wird durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Anfärbung mit Ethidiumbromid identifiziert (Fig. 1). Figur 1 zeigt das Gel-

bild eines PCR-amplifizierten bisulfitbehandelten DNA-Stranges (links: Molekulargewichtsmarker, rechts: PCR-Produkt)

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen in
5 DNA, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Arbeitsschritte ausführt:
- a) eine genomische DNA-Probe wird mit einer Lösung
eines Bisulfits (= Hydrogensulfit, Disulfit) im Kon-
10 zentrationsbereich zwischen 0,1 und 6 mol/l inkubi-
biert, wobei ein denaturierendes Reagenz und/oder Lö-
semittel sowie mindestens ein Radikalfänger zugegen
ist;
- 15 b) die behandelte DNA-Probe wird mit Wasser oder ei-
ner wässrigen Lösung verdünnt;
- c) die DNA-Probe wird in einer Polymerasereaktion
amplifiziert;
- 20 d) man detektiert, inwieweit sich die Sequenz durch
die Behandlung nach Schritt a) gegenüber der genom-
ischen DNA-Probe verändert hat und schliesst auf den
Methylierungsstatus zumindest eines Locus in der ge-
25 nomischen DNA-Probe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass das denaturierende Reagenz und/oder Lösungsmit-
tel aus der folgenden Liste von Verbindungen oder
30 Verbindungsklassen ausgewählt ist:
- Polyethylenglykoldialkylether, Dioxan und substitu-
ierte Derivate, Harnstoff oder Derivate, Acetonitril,
primäre Alkohole, sekundäre Alkohole, tertiäre Alko-
35 hole, Diethylenglykoldialkylether, Triethylenglykol-
dialkylether, Tetraethylenglykol-dialkylether, Pen-

taethylenglykoldiakylether, Hexaethylenglykoldialkylether, DMSO, THF.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Radikalfänger aus der folgenden Gruppe von Verbindungen ausgewählt ist:

Di-, Trihydroxybenzole, Grüntee Extrakt (green tea extract), Pycnogenol (pine bark extract), Ginkgo Biloba Extrakt (EGb 761), Flavonoid-Mischung verschiedener Frucht- und Gemüseextrakte (GNLD), Bio-Normalizer (Sun-O Corp), DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl), NDGA (Nordihydroguajaret-säure), Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karbonsäure), 2,6-Di-tert-butylphenol, 4-Methyl-di-tert-butylphenol, 4-Methoxy-di-tert-butylphenol, 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin Q, Hydrochinon, Ubichinon, Lignane, Hydroxyterpene, Flavonoide, Curcumin, Tannine, Retinsäureverbindungen, Ge-132 Bisbetacarboxyethyl-germanium-sesquioxid, Superoxid-Dismutase (SOD), Superoxid-Katalase, Alpha-Naphthoflavin, , Di(2-methyl-5-chlorophenyl)dithionat und Cu(II)-Derivate, Mebendazole, CS (Chloroformlöslicher) Alkaloid-Extrakt, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,2-naphthochinon, 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,2-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-1,4-naphthochinon, 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-

- naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthochinon,
5 4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-10 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
4-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
3-Brom-4-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,2-anthrachinon,
15 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-indan-1,3-dion,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3-hydroxy-4-methoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,
20 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-3,4-epoxy-3,4-dimethoxy-3,4-dihydro-2H-naphthalin-1-on,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-indan-1-on,
25 3,3-Bi-[2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-inden-1-on]-3-yl,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-brom-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-chlor-30 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
35 2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-

- anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-
5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-
anthrachinon,
2-Brom-3-(3,5-dibrom-4-hydroxyphenyl)-5,5,8,8-
tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-anthrachinon,
2-Brom-3-(3-brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-
hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydro-1,4-
anthrachinon,
3-Brom-2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-
anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-1,4-
anthrachinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1,4-
anthrachinon,
5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalin-1,3-
diol,
3-Methoxy-5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-
tetrahydronaphthalin-1-ol,
4-(3-Chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-1,4,5,6,7,8-
hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
Methyl-4-(3-chlor-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoat,
4-(3-Hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-yl)-
benzoesäure,
Methyl-(3-methoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-2-
yl)-benzoesäure,
4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl)-benzoesäure,
Methyl-4-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalin-
2-yl-azo)-benzoat,
4-(3-Hydroxy-5,5,8,8-tetramethyl-1,4-dioxo-
1,4,5,6,7,8-hexahydroanthracen-2-yl-azo)-benzoesäure,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-

- 5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydrocyclopenta[b]naphthalin-1,2-dion,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-oxocyclohexa-2,5-dienyliden)-
5,5,8,8-tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydroanthracen-3H-
1,2,4-trion,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-6-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-methoxy-5,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-5-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-ethylthio-6-methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,8-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6,7-dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5-methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5-

- 5 methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-6-
methyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-6-
methyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,6-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3-Brom-5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-
5,6-dimethyl-1,4-naphthochinon,
10 3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,6-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
2-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-3-hydroxy-5,7-
dimethyl-1,4-naphthochinon,
3-(3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxy-5,7-
15 dimethyl-1,4-naphthochinon.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass man die genomische DNA-
Probe vor der Behandlung thermisch denaturiert.
- 20 5. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass
man den Schritt c) in zwei Teilschritten wie folgt
durchführt:
- 25 a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem
Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine
nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch
hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein
Amplifikat ergeben;
- 30 b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation
gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Se-
quenz, die jeweils zu einem Abschnitt der nach An-
spruch 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-
35)-Strang] identisch oder komplementär sind und die zu
amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

- 5 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt.
- 10 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Polymerase-reaktion eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.
- 15 8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man vor Schritt c) des Anspruchs 1 eine Desulfonierung der DNA durchführt.
- 20 9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:
- 25 a) die amplifizierte genomische DNA wird an mindestens ein Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplex hybridisiert, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;
- 30 (b) man das Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei das Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in
- 35 der genomischen DNA-Probe abhängt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausgeführt:

(a) man hybridisiert einen Satz von Oligonukleotiden an die amplifizierte genomische DNA unter Ausbildung einer Duplex, wobei dieser Satz von Oligonukleotiden aus zwei verschiedenen Spezies besteht und wobei die hybridisierten Oligonukleotide der ersten Spezies mit ihrem 3'-Ende unmittelbar oder im Abstand von bis zu 10 Basen an die Positionen angrenzen, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind und wobei das zweite Oligonukleotid der zweiten Spezies an eine zweite Region des Zielmoleküls hybridisiert, so dass das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies durch eine Lücke von der Größe eines Einzelnukleotides oder bis zu 10 Nukleotiden vom 3'-Ende des hybridisierten Oligonukleotids der ersten Spezies an der Stelle der besagten ausgewählten Position getrennt ist;

(b) man das Oligonukleotid der ersten Spezies mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden mittels einer Polymerase um höchstens die Anzahl von Nukleotiden verlängert, die zwischen dem 3'-Ende des Oligonukleotids der 1. Spezies und dem 5'-Ende des Oligonukleotids der 2. Spezies liegen, wobei die Verlängerung vom Methylierungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt;

(c) man inkubiert die Oligonukleotide in Gegenwart einer Ligase, wobei das angrenzende, durch die Polymerasereaktion verlängerte Oligonukleotid der ersten Spezies und das Oligonukleotid der zweiten Spezies

verbunden werden und man dadurch ein Ligationsprodukt erhält, sofern im vorangehenden Schritt eine Verlängerung des Oligonukleotids der ersten Spezies derart erfolgte, dass nun das 3'-Ende mit vorhandener 3'-Hydroxyfunktion des verlängerten Oligonukleotids unmittelbar an das 5'-Ende des Oligonukleotids der zweiten Spezies angrenzt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten Oligonukleotide der ersten Spezies und/oder die verwendeten Oligonukleotide der zweiten Spezies entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man für die Detektion der vorbehandelten DNA die PCR-Produkte auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und man anschließend die folgenden Teilschritte ausführt:

(a) man hybridisiert die amplifizierte genomische DNA an mindestens ein Oligonukleotid mit bekannter Sequenz von n Nukleotiden unter Ausbildung einer Duplex, wobei besagte hybridisierte Oligonukleotide mit ihrem 3'-Ende teilweise oder vollständig an die Positionen hybridisieren, die hinsichtlich ihrer Methylierung in der genomischen DNA-Probe zu untersuchen sind;

(b) man das Oligonukleotid, sofern es mit seinem 3'-Terminus zuvor ohne Basenfehlpaarungen an die zu untersuchenden Position hybridisierte, mittels einer Polymerase mindestens um ein Nukleotid verlängert, wobei mindestens ein Nukleotid eine nachweisbare Markierung trägt und die Verlängerung vom Methylierung

rungsstatus des jeweiligen Cytosins in der genomischen DNA-Probe abhängt.

- 5 13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte für die Detektion mit einer nachweisbaren Markierung versieht.
- 10 14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 15 15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.
- 20 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Nukleotide ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachweisbar sind.
- 25 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte insgesamt im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.
- 30 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man jeweils ein Fragment der PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte im Massenspektrometer nachweist.
- 35 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man das Fragment des PCR-Produkts und/oder Verlängerungsprodukts und/oder Ligationsprodukts durch

Verdau mit einer oder mehrerer Exo- oder Endonukleasen erzeugt.

- 5 20. Verfahren nach Anspruch 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass man zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente mit einer einzelnen positiven oder negativen Nettoladung versieht.
- 10 21. Verfahren gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte und/oder Verlängerungsprodukte und/oder Ligationsprodukte mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI-TOF) oder
15 mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) detektiert und visualisiert.
- 20 22. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei man die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhält, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger
25 und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.
- 30 23. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen;
35 psychotische Störungen und Persönlichkeits-

- 5 störungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.
- 10
24. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
- 15
25. Kit, bestehend aus einem Bisulfit enthaltenen Reagenz, denaturierenden Reagenzien oder Lösungsmitteln, sowie Radikalfängern und Primern zur Herstellung der Amplifikate, sowie eine Anleitung zur Durchführung eines Assays nach einem der Ansprüche 1 bis 22.
- 20

Fig. 1



SEQUENZPROTOKOLL

5 <110> Epigenomics AG

 <120> Verfahren zum Nachweis von Cytosin-Methylierungen

 <130> E01/1204/WO

10 <140>

 <141>

 <160> 2

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

 <210> 1

 <211> 28

 <212> DNA

20 <213> Künstliche Sequenz

 <220>

 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

25 <400> 1

 agggagtttt ttttagggaa tagaggga 28

 <210> 2

30 <211> 28

 <212> DNA

 <213> Künstliche Sequenz

 <220>

35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

 <400> 2

 taatccaaa acctotccac tacaacaa 28

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/098528 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68,
G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/02274

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Juni 2001 (19.06.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 29 915.6 19. Juni 2000 (19.06.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24,
10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERLIN, Kurt
[DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5,
10178 Berlin-Mitte (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 28. November 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CYTOSINE METHYLATIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: Disclosed is a method for detecting 5-methylcytosine in genomic DNA samples. First, genomic DNA from a DNA sample is chemically reacted with a reagent, 5-methylcytosine and cytosine reacting differently. The pre-treated DNA is then amplified with primers from a different sequence using a polymerase. In the following step, the amplified genomic DNA is hybridised to an oligonucleotide array and PCR products are obtained which must be provided with an identifying mark. Alternatively, the PCR products can be extended in a Primer Extension Reaction, the extension products also being provided with an identifying mark. The last step involves examining the extended oligonucleotides for the presence of the identifying mark.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zum Nachweis von 5-Methylcytosin in genomischen DNA-Proben. Zuerst wird eine genomische DNA aus einer DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren. Anschließend wird die vorbehandelte DNA unter Verwendung einer Polymerase mit Primern unterschiedlicher Sequenz amplifiziert. Im nächsten Schritt wird die amplifizierte genomische DNA auf einen Oligonukleotid Array hybridisiert und PCR-Produkte erhalten, die mit einer Markierung versehen sein müssen. Alternativ können die PCR-Produkte in einer Primer Extension Reaktion verlängert werden, wobei auch die Verlängerungsprodukte mit einer Markierung versehen sind. Im letzten Schritt werden die verlängerten Oligonukleotide auf das Vorhandensein der Markierung untersucht.

WO 01/098528 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ☐ National Application No

PCT/DE 01/02274

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 21, 1 November 1998 (1998-11-01), pages 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048 | 1-3,7,8, 22-25 |
| Y | page 5009, column 2, paragraph 2 ----- -/-- | 4-6,9-21 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the International filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

16 September 2002

Date of mailing of the International search report

07/10/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bradbrook, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 01/02274

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y | WONG DAVID J ET AL: "P16-INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas." CANCER RESEARCH, vol. 57, no. 13, 1997, pages 2619-2622, XP002210105 ISSN: 0008-5472 abstract Materials and Methods | 5,6 |
| Y | WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document | 4,9-21 |
| Y | US 4 851 331 A (VARY CALVIN P H ET AL) 25 July 1989 (1989-07-25) column 3, line 31 - line 53 | 12-15 |
| Y | LANDEGREN U ET AL: "A LIGASE-MEDIATED GENE DETECTION TECHNIQUE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 241, no. 4869, 26 August 1988 (1988-08-26), pages 1077-1080, XP000676556 ISSN: 0036-8075 abstract | 10,11, 13-15 |
| Y | GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 25, no. 12, 1997, pages 2529-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 abstract; figure 1 | 9-11, 13-15 |
| Y | HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 93, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 9821-9826, XP002910406 ISSN: 0027-8424 abstract; table 1 | 12-15 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. nat. Application No

PCT/DE 01/02274

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| Y | ABRAVAYA KLARA ET AL: "Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 4, 1995, pages 675-682, XP002210106 ISSN: 0305-1048 abstract | 9-15 |
| A | CLARK SUSAN J ET AL: "High sensitivity mapping of methylated cytosines." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 15, 1994, pages 2990-2997, XP002210107 ISSN: 0305-1048 Materials and Methods | 1-25 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/02274

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9928498 | A | 10-06-1999 | DE 19754482 A1 | 01-07-1999 |
| | | | AT 217348 T | 15-05-2002 |
| | | | AU 2408599 A | 16-06-1999 |
| | | | CA 2310384 A1 | 10-06-1999 |
| | | | CN 1283235 T | 07-02-2001 |
| | | | WO 9928498 A2 | 10-06-1999 |
| | | | DE 59804090 D1 | 13-06-2002 |
| | | | DK 1034309 T3 | 26-08-2002 |
| | | | EP 1034309 A2 | 13-09-2000 |
| | | | HU 0100424 A2 | 28-06-2001 |
| | | | JP 2001525181 T | 11-12-2001 |
| | | | PL 341681 A1 | 23-04-2001 |
| | | | US 6214556 B1 | 10-04-2001 |
| US 4851331 | A | 25-07-1989 | NONE | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02274

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | PAULIN RICHARD ET AL: "Urea improves efficiency of bisulphite-mediated sequencing of 5'-methylcytosine in genomic DNA." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 21, 1. November 1998 (1998-11-01), Seiten 5009-5010, XP002210104 ISSN: 0305-1048 | 1-3,7,8, 22-25 |
| Y | Seite 5009, Spalte 2, Absatz 2 --- -/- | 4-6,9-21 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

16. September 2002

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

07/10/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bradbrook, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02274

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|--------------------|
| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| Y | WONG DAVID J ET AL: "P16-INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas." CANCER RESEARCH, Bd. 57, Nr. 13, 1997, Seiten 2619-2622, XP002210105 ISSN: 0008-5472 Zusammenfassung Materials and Methods | 5,6 |
| Y | WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) das ganze Dokument | 4,9-21 |
| Y | US 4 851 331 A (VARY CALVIN P H ET AL) 25. Juli 1989 (1989-07-25) Spalte 3, Zeile 31 - Zeile 53 | 12-15 |
| Y | LANDEGREN U ET AL: "A LIGASE-MEDIATED GENE DETECTION TECHNIQUE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, Bd. 241, Nr. 4869, 26. August 1988 (1988-08-26), Seiten 1077-1080, XP000676556 ISSN: 0036-8075 Zusammenfassung | 10,11, 13-15 |
| Y | GONZALGO M L AND JONES P A: "Rapid quantification of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE)" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 25, Nr. 12, 1997, Seiten 2529-2531, XP002106409 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung; Abbildung 1 | 9-11, 13-15 |
| Y | HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 93, 1. September 1996 (1996-09-01), Seiten 9821-9826, XP002910406 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung; Tabelle 1 | 12-15 |

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int nales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02274

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|---|--------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| Y | ABRAVAYA KLARA ET AL: "Detection of point mutations with a modified ligase chain reaction (Gap-LCR)." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 23, Nr. 4, 1995, Seiten 675-682, XP002210106 ISSN: 0305-1048 Zusammenfassung | 9-15 |
| A | CLARK SUSAN J ET AL: "High sensitivity mapping of methylated cytosines." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 22, Nr. 15, 1994, Seiten 2990-2997, XP002210107 ISSN: 0305-1048 Materials and Methods | 1-25 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02274

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9928498 | A | 10-06-1999 | DE 19754482 A1 01-07-1999 |
| | | | AT 217348 T 15-05-2002 |
| | | | AU 2408599 A 16-06-1999 |
| | | | CA 2310384 A1 10-06-1999 |
| | | | CN 1283235 T 07-02-2001 |
| | | | WO 9928498 A2 10-06-1999 |
| | | | DE 59804090 D1 13-06-2002 |
| | | | DK 1034309 T3 26-08-2002 |
| | | | EP 1034309 A2 13-09-2000 |
| | | | HU 0100424 A2 28-06-2001 |
| | | | JP 2001525181 T 11-12-2001 |
| | | | PL 341681 A1 23-04-2001 |
| | | | US 6214556 B1 10-04-2001 |
| US 4851331 | A | 25-07-1989 | KEINE |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.